



รายงานการวิจัย เรื่อง

ผลของสารสกัดต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัดเฮกเซนต่อความเป็นพิษต่อเซลล์  
การเจริญและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์  
The effect of *Cissus quadrangularis* L. hexane extract on cytotoxicity, cell  
proliferation, osteogenic differentiation, and adipogenic differentiation of human  
mesenchymal stem cells.

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช  
อาจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ 2561

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2562

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร  
งบประมาณแผ่นดินปี 2561 ในการอนุมัติเงินทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณมูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร ในพระอุปถัมภ์สมเด็จพระเจ้าภคินีเธอเจ้าฟ้า  
เพชรรัตนราชสุดา สิริโสภาพัณณวดี สำหรับความอนุเคราะห์สมุนไพรรักษา

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับ  
สถานที่ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช

หัวหน้าโครงการ

26 สิงหาคม 2562

## บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ: “ผลของสารสกัดต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัดเฮกเซนต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ การเจริญและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์”

ชื่อผู้วิจัย: 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช (หัวหน้าโครงการ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร  
2. อาจารย์ ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งอุดหนุนทุนวิจัย: งบประมาณแผ่นดิน 2561

สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ: 2562

ประเภทการวิจัย: การวิจัยพื้นฐาน

สาขาวิชา: สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

เพชรสังฆาตเป็นพืชสมุนไพรไทย ที่มีการระบุไว้ในตำรายาว่ามีฤทธิ์ในการรักษาโรคกระดูกแตกร้าว แต่ยังขาดการวิจัยถึงสารออกฤทธิ์จากต้นเพชรสังฆาตและกลไกในระดับเซลล์ต่อเซลล์คน ในการวิจัยนี้ได้สกัดสารจากต้นเพชรสังฆาตด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ตามด้วยการทำ flash column chromatography ได้สารทั้งหมด 46 fractions จากนั้นคัดเลือกส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ และมีฤทธิ์ส่งเสริมหรือยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ไขมัน ด้วยสีย้อม Alizarin red และ Oil red O ตามลำดับ ได้ 3 ส่วนสกัดคือ 8H, 14H และ 45H เมื่อตรวจวัดการสะสมแคลเซียมของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วนสกัดมีฤทธิ์ส่งเสริมการสะสมแคลเซียมของเซลล์ แต่อาจมีกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน โดยส่วนสกัด 45H มีฤทธิ์ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ส่งเสริมการแสดงออกของยีน osteopontin, RUNX2, และ osteocalcin ในขณะที่ 14H ส่งผลให้การแสดงออกของ osteocalcin ลดลง และ 8H ส่งผลให้การแสดงออกของ osteocalcin และ RUNX2 ลดลง งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาการใช้สมุนไพรเพชรสังฆาตเพื่อการรักษาโรคกระดูกต่อไป

คำสำคัญ : เพชรสังฆาต, มีเซนไคมอลสเต็มเซลล์, การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก, การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อไขมัน

## Abstract

- Research Title: “The effect of *Cissus quadrangularis* L. hexane extract on cytotoxicity, cell proliferation, osteogenic differentiation, and adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.”
- Researcher: Assistant Professor Dr. Adisr Charoenpanich (Project Leader)  
Biology, Faculty of Science, Silpakorn University  
Dr. Panupun Limpachayaporn (Co-Researcher)  
Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University
- Research Grants : Fiscal Year 2018, Silpakorn University Research, Innovation and Creativity Administration Office
- Year of completion: 2019
- Type of research: Basic research
- Subjects: Agriculture and biology

*Cissus quadrangularis* L. (CQ) is a Thai herbal plant used for bone fracture treatment. However, little is known about its bioactive compounds and its mechanisms in cellular level. In this study, hexane extract from CQ stems was fractionated by flash column chromatography. Forty six fractions were obtained and analyzed for their effects on osteogenic and adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) using alizarin red staining and oil red O staining, respectively. Three fractions with osteogenic induction potential (8H, 14H, and 45H) in combination with adipogenic induction (14H) or adipogenic reduction potential (8H and 45H) were selected. Osteogenic inductions in hMSCs of the three fractions were confirmed with calcium accretion analysis. Different underlying mechanisms in osteogenic induction of the three extracts were found as follows. 45H increased enzyme alkaline phosphatase activity and the expressions of three osteogenic marker genes: osteopontin, RUNX2, and osteocalcin. 14H increased the expression of osteocalcin while 8H reduced the expression of osteocalcin and RUNX2. Further research from the establishment of this work would benefit in the potential use of CQ for bone disease treatment.

Key words : *Cissus quadrangularis* L., mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, adipogenic differentiation

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 บทตรวจสอบเอกสาร	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	8
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	8
3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	11
บทที่ 4 ผลและวิเคราะห์การศึกษา	21
4.1 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมี	21
4.2 ตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเพชรสังฆาต ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพ ของมีเซนไคมอล-สเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน	23
4.3 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่ออัตราการรอดชีวิตของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ ด้วยวิธี AlamarBlue cell viability assay	25
4.4 ศึกษาการสะสมแคลเซียม ด้วยวิธี Calcium liquid colorimetric assay และตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส	26
4.5 ศึกษาการแสดงออกของ Osteogenic gene ด้วยวิธี Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	28
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	28
แนวทางในการดำเนินงานวิจัยต่อยอด	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก	30

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 4-1: แสดงผลของส่วนสกัดจากต้นเพชรสังฆาต ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของ มีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก และเซลล์ในเนื้อเยื่อไขมัน	23
รูปที่ 4-2: กราฟแสดงสัดส่วนปริมาณการสะสมแคลเซียมและการสะสมไขมันในมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์	24
รูปที่ 4-3 : กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์	25
รูปที่ 4-4 : กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมที่สะสมโดยเซลล์	26
รูปที่ 4-5 : รูปแสดงการติดสีย้อมของเอนไซม์ ALP	27
รูปที่ 4-6 : กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ ALP	27
รูปที่ 4-7 : กราฟการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูก osteocalcin (OC), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) และ Osteopontin (OPN)	28

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1 ลำดับการสกัดด้วยเทคนิค Flash column chromatography	12
ตารางที่ 3-2 : ตารางแสดง Primer sequence ของ Osteogenic marker differentiation	20
ตารางที่ 4-1: แสดงลักษณะทางกายภาพและปริมาณของ fraction ที่แยกได้จากส่วนสกัด hexane ด้วยเทคนิค flash column chromatography	21

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ด้วยทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความหลากหลายของพืชพรรณไม้ต่างๆ และถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและยารักษาโรค ซึ่งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่สืบทอดต่อกันมาหลายร้อยปีภายในท้องถิ่น สมุนไพรไทยเหล่านี้ถือเป็นตำรับยาที่ได้รับการยอมรับและมีการใช้อย่างแพร่หลายทั้งในระดับภูมิภาคและในระดับโลก แต่กลับมีสมุนไพรไทยจำนวนมากที่ชาวต่างชาติต่างชาติเข้ามาทำวิจัยและจดสิทธิบัตร นำไปผลิตเป็นยา ซึ่งเป็นความสูญเสียทางด้านภูมิปัญญา ทรัพยากรธรรมชาติและโอกาสทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ควรจะมีการสนับสนุนการวิจัยสมุนไพรไทย เพื่อนำมรดกที่ธรรมชาติมอบให้ขึ้นมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ปัญหาสังคมสูงอายุสร้างความกังวลใจและเป็นปัญหาที่สำคัญของชาติในปัจจุบัน โดยโรคภัยที่มากับความชราภาพ ไม่ว่าจะเป็นโรคกระดูกพรุน โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคมะเร็ง ล้วนเกิดจากความเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อ และการเสียสมดุลของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมสร้างเนื้อเยื่อทดแทน เช่น ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนโดยเฉพาะในสตรีสูงอายุวัยหมดประจำเดือน สาเหตุของโรคเกิดจากการเสียสมดุลของเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก โดยมีการสลายมวลกระดูกมากกว่าการสร้างทดแทน, ในผู้ป่วยโรคอ้วน เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไขมันและการเพิ่มการสะสมไขมันในเซลล์ที่แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย, ในผู้ป่วยโรคมะเร็งเกิดจากเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ เป็นต้น งานวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรไทย เพื่อส่งเสริมสุขภาพในการรักษาสมดุลของร่างกายจึงเป็นการตอบโจทย์ทั้งการประยุกต์ใช้ภูมิปัญญาไทย การใช้ทรัพยากรในประเทศเพื่อสร้างโอกาสทางเศรษฐกิจและการส่งเสริมสุขภาพของคนในประเทศ ตอบรับกับสังคมสูงอายุที่กำลังเกิดขึ้น

เพชรสังฆาต มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cissus quadrangularis* L. เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการระบุไว้ในตำรายาสมุนไพรไทย ว่ามีฤทธิ์ในการรักษาโรคที่หลากหลาย ทั้งรักษาโรคริดสีดวงทวาร แก้ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาการประจำเดือนไม่ปกติในผู้หญิง รักษาโรคกระดูกแตก กระดูกร้าว<sup>1,2</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยถึงแนวโน้มการใช้เพชรสังฆาตเพื่อการควบคุมน้ำหนักและรักษาโรคเบาหวาน ปรับระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด โดยพบว่าเมื่อใช้ในคนอ้วน สามารถทำให้น้ำหนักลดลง โดยมีระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดที่ดีขึ้นผ่านกลไกในการลดความอยากอาหารและทำให้เกิดการสร้างกล้ามเนื้อ<sup>3,4</sup> ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า

สารสกัดหยาบต้นเพชรสังฆาต ออกฤทธิ์ในการปกป้องตับ โดยการต้านสารอนุมูลอิสระและเพิ่มความไวต่ออินซูลิน (insulin-sensitizing activities) นอกจากนี้ยังลดการเกิดความเครียดออกซิเดชันและกดการอักเสบในหนูที่กระตุ้นให้เป็นโรคเบาหวาน<sup>5,6</sup>

อย่างไรก็ตามยังขาดการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตต่อการเจริญพัฒนาในระดับเซลล์ สมดุลการพัฒนาของสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกหรือเนื้อเยื่อไขมัน ทั้งยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาถึงฤทธิ์จากสารสกัดบริสุทธิ์จากต้นเพชรสังฆาตในเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์มีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ (human mesenchymal stem cell: hMSC) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการสร้างและซ่อมแซมเนื้อเยื่อกระดูก และเป็นเซลล์ที่สามารถจะเจริญไปเป็นเนื้อเยื่ออื่นๆ ทั้งเนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อหัวใจกระดูกอ่อน<sup>7,8</sup> โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของชีววิทยาการเจริญพัฒนา (developmental biology) ซึ่งเป็นศาสตร์ที่มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้เพื่องานทางเวชศาสตร์ฟื้นฟู (regenerative medicine) ในการบำบัดรักษาโรคชราภาพ เพื่อตอบรับกับปัญหาสังคมผู้สูงอายุในปัจจุบัน จึงนำมาสู่โครงการวิจัยในครั้งนี้

ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดต้นเพชรสังฆาตในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.ศิลปากร พบว่าเมื่อสกัดต้นเพชรสังฆาตด้วยวิธีสกัดลำดับส่วน เพื่อแยกสารออกฤทธิ์ตามความมีขั้วของสารในตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ ethanol, hexane, ethyl acetate, *n*-butanol และน้ำ พบว่าที่ 72 ชั่วโมง ส่วนสกัดในชั้น hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และมีฤทธิ์ในการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกได้ดี โครงการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาเพื่อพัฒนาต่อยอดความรู้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัดเฮกเซน ทั้งด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ในการเพาะเลี้ยงที่ยาวนานขึ้น ผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์เปรียบเทียบทั้งการเจริญพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อที่ดีคือเนื้อเยื่อกระดูก กับการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อไขมัน รวมถึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

## 1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัด hexane เพื่อเป็นฐานข้อมูลด้านความปลอดภัยในการใช้

2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัด hexane ในการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก เปรียบเทียบกับการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อไขมัน

3. ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในต้นเพชรสังฆาตและกลไกในการออกฤทธิ์ในระดับการแสดงออกของยีน ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

### ด้านวิชาการ

- เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในต้นเพชรสังฆาต ต่อการเจริญพัฒนาของสเต็มเซลล์
- มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยนี้ ในวารสารวิชาการซึ่งเป็นที่ยอมรับ
- มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการทั้งในระดับชาติ และนานาชาติ
- มีการถ่ายทอดองค์ความรู้และฝึกฝนกระบวนการวิจัยสู่ นิสิต นักศึกษา นักวิจัยและผู้สนใจ

### ด้านนโยบาย

- สร้างนักวิจัยและพัฒนาศักยภาพของนักวิจัยรุ่นใหม่
- ส่งเสริมการใช้ทรัพยากร และภูมิปัญญาท้องถิ่นให้เกิดประโยชน์แก่คนในประเทศ

### เศรษฐกิจ พาณิชย ประโยชน์ต่อสังคม

นำไปสู่การพัฒนาต้นเพชรสังฆาตเพื่อเป็นพืชสมุนไพรและพืชเศรษฐกิจ หรือผลิตยาจากความรู้เรื่องสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ทางยา สามารถเผยแพร่ความรู้ที่ได้จากการวิจัยให้กับบุคคลทั่วไปที่สนใจ โดยการจัดอบรมหรือเผยแพร่กับชุมชนโดยตรง

## บทที่ 2

### บทตรวจสอบเอกสาร

มีเซนไคมอลสเต็มเซลล์เป็นสเต็มเซลล์ที่สามารถคัดแยกได้จากเนื้อเยื่อที่เจริญสมบูรณ์แล้ว เช่น จากไขกระดูก (bone marrow) หรือ เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) จากการศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของสเต็มเซลล์ที่ได้จากไขกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันนี้ พบว่าเซลล์มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงหน้าที่เป็นเซลล์เฉพาะในเนื้อเยื่อต่างๆ ไม่จำกัดอยู่เพียงเนื้อเยื่อกระดูกหรือเนื้อเยื่อไขมัน เช่น กล้ามเนื้อ, กระดูกอ่อน, เซลล์ประสาท, เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ, และเซลล์ตับ เป็นต้น<sup>9-12</sup> มีเซนไคมอลสเต็มเซลล์จากไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells) ทำหน้าที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์กระดูก เป็นเซลล์สำรองที่อยู่ในกระดูก มีความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกเมื่อเกิดบาดแผลหรือความเสียหายของเนื้อเยื่อ<sup>13</sup> งานวิจัยจำนวนมากสนใจศึกษากลไกของเซลล์ชนิดนี้ในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก<sup>14,15</sup> รวมถึงการตอบสนองของเซลล์ต่อสิ่งเร้าทั้งทางเคมีและทางกายภาพ (chemical and physical stimuli)<sup>16-18</sup> เพื่อเป็นการพัฒนาองค์ความรู้และทำความเข้าใจในเรื่องของสมดุลกระดูก (bone homeo-stasis) กระบวนการสร้างและสลายกระดูก (bone formation and resorption)

การศึกษามีเซนไคมอลสเต็มเซลล์นอกร่างกาย (*in vitro*) พบว่าเซลล์ที่คัดแยกได้จากคุณสมบัติในการยึดเกาะกับพื้นผิว (plastic adherent isolation) มีความสามารถในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อที่จำเพาะ โดยมีความสามารถในการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ (population doublings) มากถึง 38 ครั้ง ก่อนที่เซลล์ที่เคยมีรูปร่างแหลมหัวท้าย (spindle-shape) จะเริ่มมีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์แบนบางและเสื่อมสภาพ จากการประเมินการคงคุณลักษณะในการแบ่งเซลล์ การเจริญ (growth curve) และการพัฒนาเปลี่ยนไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะ พบว่ามีเซนไคมอลสเต็มเซลล์เป็นเซลล์ที่มีการเจริญอยู่ตรงกลางระหว่างเนื้อเยื่อตัวอ่อน (embryonic tissue) และเนื้อเยื่อที่เจริญเต็มวัย (adult tissue)<sup>19</sup> ต่อมาการศึกษาถึงผลของอายุของผู้บริจาคเซลล์ต่อความเป็นสเต็มเซลล์ของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ จากอายุ 17-90 ปี พบว่าเซลล์จากผู้สูงอายุใช้เวลานานขึ้นในการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน (doubling time) มีการตายของเซลล์มากขึ้น (apoptotic) และความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกลดลง (osteogenic differentiation)<sup>20</sup>

ในการกระตุ้นให้สเต็มเซลล์มีการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกนอกร่างกายสามารถทำได้หลายวิธี วิธีหนึ่งที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายคือการใส่สารเพิ่มเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดย

สารเคมีพื้นฐานที่มีการใช้ได้แก่ ascorbic acid หรือ วิตามินซี เนื่องจากมีความสำคัญในการสังเคราะห์คอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในเนื้อเยื่อกระดูก (organic extracellular matrix) มีการเติม beta-glycerol phosphate ให้เป็นแหล่งแร่ธาตุฟอสเฟต เพื่อใช้ในการสร้างแคลเซียมฟอสเฟต เมื่อเซลล์มีการสร้างมวลกระดูก และมีการเติมสาร dexamethasone ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก<sup>21</sup>

อย่างไรก็ตามพบว่ามียังยอื่นที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกได้ โดยไม่ต้องเติม dexamethasone ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน hydrogel ซึ่งมีการปรับปรุงโครงสร้างและใส่ peptide RGD (Arg-Gly-Asp)<sup>22</sup> หรือ การกระตุ้นด้วยแรง (mechanical loading) โดยสามารถส่งเสริมการเจริญไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกของสเต็มเซลล์ เพิ่มการสะสมแคลเซียม การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนากระดูกและการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase activity) เช่น cyclic tensile strain เป็นต้น<sup>23-26</sup>

ต้นเพชรสังฆาต (*Cissus quadrangularis* L.) เป็นพืชที่มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เนื่องจากสรรพคุณทางยาสมุนไพรที่ระบุไว้มีหลายแขนงทั้งรักษาโรคเรื้อรังต่าง ๆ แก่ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ อาการประจำเดือนไม่ปกติในผู้หญิง รักษาโรคกระดูก<sup>1</sup> ซึ่งจะเห็นได้จากงานวิจัยที่ตีพิมพ์ออกมาในช่วงสิบปีที่ผ่านมา โดยมีรายงานว่าส่วนสกัดจากต้นเพชรสังฆาตมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยค่า IC<sub>50</sub> = 522 µg/mL และต้านการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase และการสร้าง melanin ใน B16 melanocytes<sup>27</sup> จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัดนี้ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ ป้องกันและรักษาโรค Syndrome X<sup>28</sup> และป้องกันและลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร<sup>29,30</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดจากต้นเพชรสังฆาตใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเสริมร่วมกับ  $\gamma$ -butyrobetaine ซึ่งจะช่วยเพิ่มกระบวนการย่อยสลายกรดไขมันในร่างกาย<sup>31</sup> และส่วนสกัดนี้กับส่วนสกัดจากใบต้น mulberry ช่วยในการควบคุมน้ำหนัก โรคเบาหวาน และกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย<sup>32</sup> นอกจากนี้ส่วนสกัดจากต้นเพชรสังฆาตมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย จากการศึกษาวิจัยยังไม่พบว่าการใช้ส่วนสกัดนี้ในหนูทดลองปริมาณ 2500 mg/kg เป็นพิษหรือมีผลข้างเคียงแต่อย่างใด<sup>33</sup>

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยส่วนสกัดหยาบในเอทานอลกับสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของต้นเพชรสังฆาตส่งเสริมการสร้าง cortical bone และ trabecular bone ในตัวอ่อนของหนูแรท เมื่อมีการให้สารสกัดกับหนูแรทที่กำลังตั้งครรภ์และศึกษามวลกระดูกในลูกหนูแรกเกิดจากแม่ที่ได้รับสารสกัด เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม<sup>34</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในเรื่องฤทธิ์ของต้นเพชรสังฆาตต่อการช่วยป้องกันโรคกระดูกพรุน โดยเป็นการทดลองในหนูแรทซึ่งถูกตัดรังไข่ เนื่องจากรังไข่เป็นแหล่งสำคัญใน

การสร้างฮอโมนเอสโตรเจน ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของการสร้างและสลายมวลกระดูก พบว่าในกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่และไม่ได้รับสารสกัด (กลุ่มควบคุม) โครงสร้างของมวลกระดูกและความสามารถในการรับแรงของกระดูกลดลงกว่า 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่การได้รับสารสกัดเอทานอลจากต้นเพชรสังฆาตในกลุ่มทดลองสามารถชดเชยความผิดปกติที่เกิดจากการถูกตัดรังไข่ และรักษาสมดุลของกระดูกในหนูแรทได้<sup>35</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเครียดออกซิเดชันในหนูแรทที่ถูกตัดรังไข่ พบว่าสารสกัดหยาบจากต้นเพชรสังฆาตสามารถลดความเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในกระดูกฟีมอร์ซึ่งเกิดจากการตัดรังไข่ของหนูแรท<sup>36</sup>

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากต้นเพชรสังฆาตด้วยเมทานอล ในหนูแรทที่มีการกระตุ้นให้เป็นโรคตับ โดยการให้อาหารที่มีไขมันและมีน้ำตาลฟรุคโตสสูง พบว่าสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตช่วยลดอาการของโรคที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยอาหารดังกล่าวได้<sup>37</sup> ในปีเดียวกันมีรายงานการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการป้องกันพิษต่อตับในหนูแรท โดยสารสกัดจากเพชรสังฆาตด้วยเมทานอล โดยการให้สารพิษ isoniazid และสารสกัดควบคู่กัน พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดมีปริมาณ lipid peroxidation น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับแต่สารพิษ isoniazid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ<sup>38</sup> การศึกษาผลของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อการป้องกันโรคอ้วน โดยทำการทดลองในหนูไมซ์ที่ได้รับอาหารไขมันสูง พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตควบคู่ไปกับการได้รับอาหารไขมันสูง มีปริมาณไขมันในร่างกาย, ขนาดของเซลล์ไขมัน, และปริมาณเนื้อเยื่อไขมันที่น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม โดยพบว่าทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์ไขมันและสะสมไขมันลดลง<sup>39</sup>

Chidambara Murthy และคณะ ได้รายงานฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านการเจริญของเชื้อ (antioxidant and antimicrobial activity) ของสารสกัดจากเพชรสังฆาตด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในปีค.ศ. 2003 โดยพบว่าส่วนสกัดด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า 60% และมากกว่าส่วนสกัดในเมทานอลหรือน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดใน ethyl acetate และเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, และ *Streptococcus*<sup>40</sup>

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อเซลล์ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดส่วนด้วย petroleum ether กับมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์จากหนูแรท โดยพบว่าออกฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น และมีการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้น<sup>41</sup> นอกจากนี้ยังมีการทดสอบกับเซลล์กระดูกออสติ-โอ بلاสต์ในหนูไมซ์ โดยพบว่าสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัดหยาบเอทานอล กระตุ้นให้เซลล์มีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสและการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้น<sup>42</sup> คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของ mitogen-activated protein kinase (MAPK) พบว่าเมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ MAPK การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทสที่เพิ่มขึ้นด้วยฤทธิ์จากสารสกัดเพชรสังฆาตมีการลดลง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ<sup>43</sup> นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสกัดเพชรสังฆาตในตัวทำละลายเฮกเซน โดยพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกของเซลล์กระดูกออสติโอ بلاสต์จากหนูเม้าส์ โดยอยู่ในระหว่างการแยกหาสารบริสุทธิ์และทดสอบหาสารออกฤทธิ์<sup>44</sup> อย่างไรก็ตามยังคงขาดการศึกษาถึงองค์ประกอบบริสุทธิ์ของต้นเพชรสังฆาต การทดสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเจริญพัฒนาของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ในมนุษย์ รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์และการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในชั้นตัวทำละลาย hexane ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าเป็นสารสกัดต้นเพชรสังฆาตในชั้นตัวทำละลาย hexane มีความเป็นพิษต่ำและสามารถส่งเสริมการเจริญพัฒนาของสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกได้ดี โครงการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ เพื่อศึกษาผลของส่วนสกัด hexane จากต้นเพชรสังฆาต ต่อการเจริญของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ การเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่อไขมันของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ในระดับการแสดงออกของยีน เพื่อนำไปสู่การสกัดสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการรักษาสมดุลของการเจริญพัฒนาของสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกหรือเนื้อเยื่อไขมันต่อไป

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงาน

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

##### วัสดุและอุปกรณ์

1. จานหลุม (Microwell plate) (บริษัท NUNC, Denmark)
2. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell culture flask T-75 cm<sup>2</sup>) (Nunclon Catalog #085391)
3. ขวดแก้ว (laboratory bottle)
4. ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet class 2) (ยี่ห้อ Haier รุ่น 1200-IIA2-D, china)
5. ตู้ดูดควัน (Fume hood)
6. ไมโครปิเปต (Micropipette/ Autopipette)
7. ไมโครปิเปตแบบหลายช่อง (Multichannel pipette)
8. พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur Pipette)
9. ปิเปต (Pipette)
10. ไมโครปิเปตต์ทิว (Micropipette tip)
11. หลอดเซนตริฟิวก์พลาสติก (Centrifuge tube)
12. หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube)
13. ที่กรองอาหาร (Sterilization filter)
14. กระดาษกรอง (Filter Papers)
15. ปีกเกอร์ (Beaker)
16. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)
17. ช่องนับจำนวนเซลล์ (Haemocytometer) (BOECO, Germany)

18. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope) (บริษัท Olympus รุ่น CK30)
19. ตู้บ่ม (CO2 incubator) (บริษัท GIBTHAI ยี่ห้อ SHELLAB)
20. เครื่องชั่งสารเคมี (Balance) (บริษัท Satorius Basic)
21. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (บริษัท Bio-active จำกัด รุ่น A066974)
22. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (Spin down centrifuge)
23. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (บริษัท DAIHAN Scientific)
24. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader) (บริษัท Bio-active จำกัด รุ่น A066974)
25. เครื่องโยก (Plate shaker)
26. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal cycler) (บริษัท BioRad รุ่น T 100, USA)
27. nanodrop spectrophotometer
28. เครื่องตรวจสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Real-Time PCR System) (บริษัท Applied Biosystems รุ่น ABI 7500 Fast, USA)

#### สารเคมี

1. สารสกัดจากต้นเพชรสังฆาต (ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร)
2. Complete Growth Medium : Minimum Essential Medium Eagle - alpha modified supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% l-glutamine, 100 U/mL pencillin and 100 µg/mL streptomycin.
3.  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, alpha-modified with L-glutamine) (Hyclone, USA, Catalog #SH30265.02)
4. Adipogenic Differentiation Medium : Minimum Essential Medium Eagle - alpha modified supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM l-glutamine, 100 U/mL pencillin,

100 µg/mL streptomycin, 1 µM dexamethasone, 500 µM isobutylmethylxanthine (IBMX) , 10 µg/mL h-Insulin and 100 µM indomethacin.

5. Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, USA, Catalog #SV30160.03)
6. Penicillin Streptomycin (Pen/Strep) (Corning®, USA, Catalog #30-002-CI)
7. L-glutamine (Corning®, USA, Catalog #SH30034.02)
8. Dexamethasone (Sigma, USA, Catalog #D8893-1MG)
9. H-Insulin (Sigma, USA, Catalog #I9278-5ML)
10. Indomethacin (Sigma, USA, Catalog #I7378-5G)
11. Isobutylmethylxanthine (IBMX) (Sigma, USA, Catalog #I5879-1G)
12. phosphate buffered saline (PBS) (Hyclone, USA, Catalog #SH30258.02)
13. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, Canada, Catalog #VX25200072)
14. Trypan blue (Fluka, Catalog #093590)
15. Oil red O (Sigma-Aldrich, USA, Catalog #00625-25G)
16. Formaldehyde (BDH, Catalog #101133W)
17. 2-propanol (BDH, Catalog #UN1219)
18. Ethanol (Merck, Germany, Cas no.64-17-5)
19. น้ำกลั่น (Distilled water)
20. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
21. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Biochemical, USA, Catalog #PC0906)
22. Alamarblue (Invitrogen™, USA, Catalog #DAL1025)

## 3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

### 3.2.1. การแยกองค์ประกอบทางเคมี

#### 3.2.1.1 การสกัดหยาบเพชรสังฆาตด้วย Ethanol

1. แช่ผงเพชรสังฆาตอบแห้ง 600 กรัม ด้วย Ethanol 2,400 มล. ในขวดรูปชมพู่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกวนของผสมเป็นครั้งคราว

2. กรองผงเพชรสังฆาตออกจากส่วนสกัด Ethanol แล้วนำส่วนสกัดไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนสกัดหยาบ Ethanol ของเพชรสังฆาต

3. นำผงเพชรสังฆาตที่กรองออกในข้อ 2 มาสกัดด้วย Ethanol ต่ออีก 2 รอบ รอบละ 2,400 มล. ตามข้อ 1 และ 2 จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบ Ethanol ทั้งหมด และนำไปชั่งน้ำหนัก

#### 3.2.1.2 การสกัดลำดับส่วนเพชรสังฆาต (Hexane, Ethyl acetate, n-butanol, น้ำ)

1. นำส่วนสกัดหยาบ Ethanol ทั้งหมดมาเติมน้ำกลั่น 200 มล. แล้วสกัดด้วย hexane 400 มล. ใน separatory funnel แล้วปล่อยให้ไวให้แยกชั้นชัดเจน

2. ไขส่วนที่เป็นชั้น organic (ชั้น hexane) ออกมา แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนสกัด hexane

3. นำชั้นน้ำที่ได้จากข้อ 2 มาสกัดด้วย hexane ซ้ำอีก 2 รอบ รอบละ 400 มล. ตามข้อ 1 และ 2 จะได้ส่วนสกัด hexane ทั้งหมด และนำไปชั่งน้ำหนัก

4. นำชั้นน้ำที่ได้จากข้อ 3 มาสกัดด้วย ethyl acetate 400 มล. ปล่อยให้ไวให้แยกชั้นชัดเจน

5. ไขส่วนที่เป็นชั้น organic (ชั้น ethyl acetate) ออกมา แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนสกัด ethyl acetate

6. นำชั้นน้ำที่ได้จากข้อ 5 มาสกัดด้วย ethyl acetate ซ้ำอีก 2 รอบ รอบละ 400 มล. ตามข้อ 4 และ 5 จะได้ส่วนสกัด ethyl acetate ทั้งหมด และนำไปชั่งน้ำหนัก

7. นำชั้นน้ำที่ได้จากข้อ 6 มาสกัดด้วย n-butanol 400 มล. ปล่อยให้ไวให้แยกชั้นชัดเจน

8. ไขส่วนที่เป็นชั้น organic (ชั้น n-butanol) ออกมา แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนสกัด n-butanol

9. นำชั้นน้ำที่ได้จากข้อ 8 มาสกัดด้วย n-butanol ซ้ำอีก 2 รอบ รอบละ 400 มล. ตามข้อ 7 และ 8 จะได้ส่วนสกัด n-butanol ทั้งหมด และนำไปชั่งน้ำหนัก

10. นำชั้นน้ำที่เหลือจากข้อ 9 ไประเหยน้ำออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนสกัดน้ำ

### 3.2.1.3 การแยกส่วนสกัด hexane ด้วยเทคนิค flash column chromatography

1. หาระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการชะสารออกจากคอลัมน์ด้วยเทคนิคTLC
2. ทำการ pack column โดยใช้ซิลิกาเจลขนาดเล็ก
3. ปรับสภาพ column ด้วย 100% hexane 500 มล.
4. ละลายสารสกัด hexane 24.1931 กรัม ด้วย dichloromethane แล้วนำมาเคลือบลงบนซิลิกาเจลขนาดเล็ก โดยใช้ซิลิกาเจลไม่เกินสามเท่าของสาร แล้วระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง
5. ถ่ายสารสกัด hexane ที่แห้ง ลงบนคอลัมน์ที่เตรียมไว้
6. ทำการชะ column ที่ต่อกับเครื่องปั๊ม ด้วยเฟสเคลื่อนที่ (ตัวทำละลาย) ครั้งละ 500 มล. (โดยใช้กระดาษกรองรองบนหน้าสาร เพื่อป้องกันหน้าสารพังขณะชะตัวทำละลาย) ซึ่งในการชะสารออกจาก column ด้วยตัวทำละลายจะเริ่มจากระบบตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำและค่อยๆ เพิ่มขั้วของระบบตัวทำละลายขึ้นช้าๆ โดยในแต่ละรอบของการชะจะวิเคราะห์ห้องค์ประกอบเบื้องต้นของสารที่ชะออกมาด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) หากพิจารณาแล้วเห็นว่าระบบตัวทำละลายที่ใช้อยู่ชะสารออกจาก column ได้ไม่มีประสิทธิภาพแล้ว จะเปลี่ยนระบบตัวทำละลายให้มีขั้วสูงขึ้นทันที โดยการทดลองนี้ใช้ระบบตัวทำละลายและปริมาณดังแสดงในตารางที่ 3-1 ตามลำดับ

ตารางที่ 3-1 ลำดับการสกัดด้วยเทคนิค Flash column chromatography

No.	Solvent	Times	Volume (ml)	Fraction
1.	100% hexane	5	2,500	1-5
2.	1% Ethyl acetate/Hexane	5	2,500	6-10
3.	2% Ethyl acetate/Hexane	5	2,500	11-15
4.	3% Ethyl acetate/Hexane	6	3,000	16-21
5.	4% Ethyl acetate/Hexane	7	3,500	22-28
6.	5% Ethyl acetate/Hexane	7	3,500	29-35
7.	6% Ethyl acetate/Hexane	6	3,000	36-41
8.	7% Ethyl acetate/Hexane	5	2,500	42-46
9.	9% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	47-49
10.	12% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	50-52
11.	20% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	53-55
12.	25% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	56-58
13.	30% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	59-61
14.	35% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	62-64
15.	40% Ethyl acetate/Hexane	2	1,000	65-66
16.	50% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	67-69

17.	60% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	70-72
18.	80% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	73-75
19.	90% Ethyl acetate/Hexane	3	1,500	76-78
20.	100% Ethyl acetate	2	1,000	79-80
21.	2% Methanol/Ethyl acetate	1	500	81
22.	5% Methanol/Ethyl acetate	1	500	82
23.	10% Methanol/Ethyl acetate	3	1,500	83-85
24.	100% Methanol	2	1,000	86-87

7. ตรวจสอบองค์ประกอบของแต่ละ fraction (1-87 fractions) ด้วยเทคนิค TLC แล้วทำการรวมองค์ประกอบที่เหมือนกันได้เป็น 1H-46H

8. ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

9. ชั่งน้ำหนักสารที่แยกได้ (1H-46H)

### 3.2.2 การเตรียมสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตเพื่อทดสอบในเซลล์

ชั่งสารสกัดจากเพชรสังฆาตในส่วนสกัด ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ประมาณ 0.0005-0.0010 กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นเป็น 1 µg/µl โดยการละลายด้วยตัวทำละลาย 0.01% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Biochemical, USA, Cat No.PC0906) นำไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสารละลาย จากนั้นเติม Basal Medium (Minimum Essential Medium Eagle, alpha-modified with L-glutamine ( $\alpha$ -MEM) (Hyclone, USA, Cat No.SH30265.02) ผสมสารละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์

เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์จากไขกระดูก (Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells : UE7T-13) จาก Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB) ใช้อาหาร Complete Growth Medium (CGM) [Minimum Essential Medium Eagle, alpha-modified with L-glutamine ( $\alpha$ -MEM) (Hyclone, USA, Cat No.SH30265.02), 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, USA, Cat No.SV30160.03) , 2 mM L-glutamine (Corning®, USA, Cat No.SH30034.02) และ 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Corning®, USA, Cat No.30-002-CI) ] ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 75 cm<sup>2</sup> (Nunclon Cat. No.085391) ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ ในตู้ CO<sub>2</sub> Incubators (บริษัท SHELLAB)

Subculture เมื่อเซลล์เจริญเติบโต 80-90% ของพื้นที่ผิวขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ โดย Subculture ratio 1:4 และตลอดทั้งการทดลองใช้ Passage 8-10

### 3.2.4 ตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเพชรสังฆาต ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก

เพาะเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 24 หลุม (NUNC, Cat No.143982) จำนวน หลุมละ  $2 \times 10^4$  เซลล์ ในอาหาร CGM ปริมาตรหลุมละ 600  $\mu$ l เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบฤทธิ์สารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตใน Hexane ที่ความเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml ใน Osteogenic Differentiation Medium (ODM) ปริมาตรรวม 600  $\mu$ l/หลุม จำนวน 2 ซ้ำ [Minimum Essential Medium Eagle, alpha-modified with L-glutamine ( $\alpha$ -MEM) (Hyclone, USA, Cat No.SH30265.02), 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, USA, Cat No.SV30160.03) , 2 mM L-glutamine (Corning®, USA, Cat No.SH30034.02) , 100  $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (Corning®, USA, Cat No.30-002-CI) , 0.1  $\mu$ M Dexamethasone (Sigma, USA, Cat No.D8893-1MG , 50  $\mu$ M Ascorbic acid (Sigma, USA, Cat No.50-81-7) และ 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate (BGP) (Sigma, USA, Cat No.113170-55-1)] เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ใน CGM และ ODM ปริมาตร 600  $\mu$ l/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ ในตู้ CO<sub>2</sub> Incubators โดยเปลี่ยนอาหารหลุมละ 300  $\mu$ l/หลุม ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นนำไปศึกษาการสะสมแคลเซียมของเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกด้วยวิธีย้อมสี Alizarin Red และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (บริษัท PerkinElmer รุ่น VICTOR Nivo)

การย้อมสี Alizarin red เป็นการศึกษาการสะสมแคลเซียมภายนอกเซลล์ เมื่อ Alizarin red จับกับแคลเซียมจะเกิดเป็นผลึกสีแดงของ Alizarin red S-calcium complex ซึ่งจัดเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ หลังจากการชักนำเซลล์ UE7T-13 ให้เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม เป็นระยะเวลา 14 วัน นำมาย้อมสี Alizarin red <sup>45</sup> โดยดูดอาหารเก่าทิ้ง ล้างด้วย Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Hyclone, USA, Cat No.SH30258.02) หลุมละ 200  $\mu$ l จำนวน 2 ครั้ง ทำการ Fixed เซลล์ด้วย 4% Paraformaldehyde (BOH, Cat No.101133W) หลุมละ 200  $\mu$ l บ่มทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่น หลุมละ 200  $\mu$ l จำนวน 2 ครั้ง ย้อมสีด้วย 2%(w/v) Alizarin red , pH 4.1 (Sigma, USA, Cat No.130-22-3) หลุมละ 100  $\mu$ l บ่มทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น หลุมละ 100  $\mu$ l จำนวน 2 ครั้ง และบันทึกภาพเซลล์ที่ได้ด้วยกล้องถ่ายภาพและ Inverted

microscope (บริษัท Olympus รุ่น CK30) หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบข้อมูลเชิงปริมาณตามโปรโตคอลของ ScienCell™ ด้วยการเติม 10%(v/v) Acetic acid (Sigma, USA, Cat No.64-19-7) หลุมละ 100 µl เขย่าที่ อุณหภูมิห้องด้วยเครื่อง Shaker plate 30 นาที ใช้ Tip ขูดเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์และดูดสารละลาย ทั้งหมดใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไป Vortex (บริษัท Scientific Industries) 30 วินาที ใช้ Parafilm พันรอบฝา tube แช่ใน Water bath (บริษัท DAIHAN Scientific) ที่อุณหภูมิ 85 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที โดยหลีกเลี่ยงการเปิดฝาจกกว่า tube จะเย็น นำไป Centrifuge (บริษัท Hettich UNIVERSAL) ที่ 1,500g เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วน Supernatant ใส่ใน Microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 10%(v/v) Ammonium hydroxide (Sigma, USA, Cat No.1336-21-6) 75 µl เพื่อ Neutralize กรด โดย pH ควรอยู่ในช่วง 4.1-4.5 ดูดสารละลายจาก tube ใส่ใน Microplate ขนาด 96 well หลุมละ 50 µl จำนวน 4 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย T-test

### **3.2.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ไปเป็นเซลล์ไขมัน โดยทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในชั้นของส่วนสกัดเฮกเซน**

เพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์จากไขกระดูก (UE7T-13, JCRB# 1154 passage 10) ใน 48 well plate (NEST, Denmark, Catalog #748001) จำนวนหลุมละ  $1 \times 10^4$  เซลล์ ในอาหาร adipogenic differentiation medium (ADM) ปริมาตรหลุมละ 300 µl ที่มีสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในชั้นของส่วนสกัดเฮกเซน คือ 8H 14H และ 45H ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml จำนวน 5 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ใน adipogenic differentiation medium (ADM) และ complete growth medium (CGM) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO<sub>2</sub> ในตู้ incubator โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ 3 วัน หลุมละ 150 µl เป็นระยะเวลา 21 วัน

### **3.2.6 ศึกษาผลของการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตโดยตรวจวัดปริมาณการสะสม**

**ไขมันภายในเซลล์ด้วยสีย้อม Oil red O และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร**

หลังจากการชักนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกไปเป็นเซลล์ไขมันเป็นระยะเวลา 21 วัน ดูดอาหารเก่าทิ้งทุกหลุม ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) จากบริษัท Hyclone (USA, Catalog #SH30258.02) หลุมละ 500 µl จำนวน 2 ครั้ง ทำการ fixed เซลล์ด้วย 4% formaldehyde หลุมละ 500 µl ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จำนวน 2 ครั้ง และเติม 60% isopropanol หลุมละ 500 µl ทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วยสีย้อม Oil red O/60% isopropanol

เป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท Sigma-Aldrich (USA, Catalog #00625-25G) หลุมละ 200 µl ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น หลุมละ 500 µl จำนวน 2-5 ครั้ง หากล้างสีย้อมไม่หมดให้เติม 60% isopropanol หลุมละ 3-5 หยด ทิ้งไว้ 30 วินาที ดูดทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่น บันทึกภาพเซลล์ที่ได้ หลังจากวัดปริมาณการสะสมของไขมันโดย เติม 100% isopropanol หลุมละ 500 µl นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า (plate shaker) 15 นาที ดูดสารละลายเซลล์จาก 24 well plate ใส่ใน 96 well plate หลุมละ 100 µl จำนวน 5 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader และวิเคราะห์ผลค่าสถิติ t-test

### 3.2.7 ศึกษาการอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ ด้วยวิธี AlamarBlue cell viability assay ใน fraction ที่ผ่านการคัดเลือก 3 fraction

AlamarBlue cell viability เป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต โดยการดู Reduction ของเซลล์ด้วยสี Resazurin ที่มีสีน้ำเงิน เมื่อถูก Reduced ด้วย Mitochondrial reductase จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีชมพูของสี Rezorufin และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ หลังจากการชักนำเซลล์ UE7T-13 ให้เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม เป็นระยะเวลา 3 , 7 และ 10 วัน นำมาวัดอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธี AlamarBlue cell viability assay <sup>46</sup> โดยการดูอาหารเก่าทิ้ง ล้างด้วย PBS หลุมละ 200 µl จำนวน 1 ครั้ง แล้วเติมอาหาร CGM ที่มี 10% AlamarBlue หลุมละ 100 µl ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ ในตู้ CO<sub>2</sub> Incubators เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ป้องกันไม่ให้โดนแสง ดูดสารละลายใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม หลุมละ 100 µl จำนวน 4 ซ้ำ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 และ 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader ล้างเซลล์ด้วย PBS หลุมละ 200 µl จำนวน 1 ครั้ง และเติมอาหารลงไปในแต่ละหลุมตาม Condition เดิมก่อนที่จะนำมาวัดค่า เลี้ยงต่อจนครบ 7 และ 10 วัน และนำมาวัดอัตราการรอดชีวิตอีกครั้ง จากนั้นคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ โดยการเปรียบเทียบ %Reduced ของกลุ่มทดสอบสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตกับกลุ่มควบคุม CGM และกลุ่มควบคุม ODM นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\% \text{Reduced} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(N_1 \times P_2) - (N_2 \times P_1)} \times 100$$

$O_1$  = Molar extinction coefficient (E) of oxidized AlamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 570 nm = 80586

$O_2$  = E of oxidized AlamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร = 117216

$N_1$  = E ของ reduced AlamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร = 155677

$N_2$  = E ของ reduced AlamarBlue® ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร = 14652

$A_1$  = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม Sample ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

$A_2$  = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม Sample ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

$P_1$  = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม Blank (Positive control) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

$P_2$  = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม Blank (Positive control) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

### 3.2.8 ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane 3 fraction ที่ผ่านการคัดเลือก คือ 8H , 14H และ 45H ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก โดยเพิ่มช่วงความเข้มข้นในการทดสอบ

เพาะเลี้ยงเซลล์ UE7T-13 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม (NUNC, Cat No.167008) จำนวนหลุมละ  $5 \times 10^3$  เซลล์ ในอาหาร CGM ปริมาตรหลุมละ 200  $\mu$ l เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบฤทธิ์สารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane ที่ความเข้มข้น 5 , 10 , 20  $\mu$ g/ml ในอาหาร ODM ปริมาตรรวม 200  $\mu$ l/หลุม จำนวน 6 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เพาะเลี้ยงเซลล์ใน CGM และ ODM ปริมาตร 200  $\mu$ l/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ ในตู้  $CO_2$  Incubators โดยเปลี่ยนอาหารหลุมละ 100  $\mu$ l/หลุม ทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นนำไปศึกษาการอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ ด้วยวิธี AlamarBlue cell viability assay ศึกษาการสะสมแคลเซียมของเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกด้วยวิธีย้อมสี Alizarin Red และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วิธี Calcium liquid colorimetric assay ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) ด้วยวิธี ALP staining และ Alkaline phosphatase activity (ALP activity) เพื่อหาลำดับส่วนและความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกมากที่สุด จากนั้นนำมาศึกษาการแสดงออกของ Osteogenic gene ด้วยวิธี Quatitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

### 3.2.9 การตรวจวัดการสะสมแคลเซียม ด้วยวิธี Calcium liquid colorimetric assay

Calcium liquid colorimetric assay เป็นการวัดปริมาณแคลเซียมที่เกิดจากการสะสมของเซลล์ โดย แคลเซียมไอออนจะจับกับ O-cresolphthalein complexone ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีม่วง หลังจากการชักนำเซลล์ UE7T-13 ให้เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม เป็นระยะเวลา 14 วัน นำมาศึกษาการสะสมแคลเซียมด้วยวิธี Calcium liquid colorimetric assay<sup>47</sup> โดยดูดอาหารเก่าทิ้ง ล้างด้วย DPBS (PBS without calcium or magnesium) หลุมละ 100  $\mu$ l จำนวน 2 ครั้ง เติม HCl ความเข้มข้น 0.1 M หลุมละ 50  $\mu$ l นำงานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C (ไม่เกิน 1 เดือน) ละลายสารละลายแคลเซียมในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยการเขย่าด้วยเครื่อง Shaker plate ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดสารละลายใส่ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำ สารละลายแคลเซียมให้เป็นสารละลายเจือจางในอัตราส่วน 1: 10 โดยดูดสารละลายแคลเซียม 1  $\mu$ l มาเจือจางด้วย 0.1 M HCl 9  $\mu$ l จากนั้นดูดใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม ปริมาตร 10  $\mu$ l จำนวน 5 ซ้ำ เติม Chromogenic reagent 190  $\mu$ l นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ  $\text{CaCl}_2$  เพื่อหาปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์

### 3.2.10 ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) ด้วยวิธี ALP staining และ Alkaline phosphatase activity (ALP activity)

Alkaline phosphatase (ALP) เป็นเอนไซม์ที่พบในระหว่างการสร้างเซลล์กระดูก โดยเอนไซม์ ALP จะเร่งปฏิกิริยา Hydrolysis p-nitrophenyl phosphate (pNPP) ที่ไม่มีสีให้เปลี่ยนเป็น p-nitrophenol ที่มีสีเหลือง หลังจากการชักนำเซลล์ UE7T-13 ให้เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม เป็นระยะเวลา 3 และ 7 วัน นำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ALP ด้วยวิธี ALP staining จำนวน 1 หลุม โดยดูดอาหารเก่าทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS 200  $\mu$ l จำนวน 2 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วย 0.2%(v/v) NBT/BCIP stock solution ปริมาตร 30  $\mu$ l นำมาถ่ายรูปภายใต้กล้อง Inverted microscope เพื่อดูความแตกต่างของการทำงานของเอนไซม์ ALP จากนั้นนำไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ALP ด้วยวิธี ALP activity<sup>48</sup> โดยดูดอาหารเก่าทิ้ง ล้างด้วย PBS หลุมละ 200  $\mu$ l จำนวน 2 ครั้ง เติม Lysis buffer 50  $\mu$ l นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและละลายเซลล์ (Freeze-thaw) เพื่อให้เซลล์แตก 3 รอบ เติม pNPP ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 100  $\mu$ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเครื่อง Microplate reader รอจนอุณหภูมิถึงค่าที่ตั้งไว้ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรไป โดยทำการวัดค่าทุกๆ 5 นาที (Kinetic) จำนวน 6 ครั้ง บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำมาคำนวณดังสูตร

$$\text{Volume activity (IU/ml)} = \frac{(\Delta A_s - \Delta A_o) \times V_a(\text{ml})}{18.2 \times V_s(\text{ml})}$$

$\Delta A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$\Delta A_o$  = ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

$V_a$  = ปริมาณสารทั้งหมด (ml)

$V_s$  = ปริมาณสารตัวอย่าง (ml)

18.2 = Millimolar extinction coefficient of pNPP under the assay condition (cm<sup>2</sup>/μmol)

### 3.2.11 ศึกษาการแสดงออกของ Osteogenic gene ด้วยวิธี Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) เป็นการศึกษาการแสดงของ ยีนในระดับ mRNA หลังจากการชักนำเซลล์ UE7T-13 ให้เปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกในงาน เพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุม เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลือกใช้ความเข้มข้น 10 และ 20 μg/ml เนื่องจากที่ความเข้มข้นนี้เห็นความแตกต่างของการสะสมแคลเซียมในเนื้อเยื่อกระดูกได้มากกว่าที่ความเข้มข้น 5 μg/ml นำมาสกัด mRNA ด้วยชุดสกัด RNA Purification Mini kit (RNA Purification Mini kit (Favorgen, Cat No.FATRK001-1) จากนั้นวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอโดยใช้เครื่องวัด NanoDrop spectrophotometers (บริษัท Thermo Fisher Scientific รุ่น 2000) โดย mRNA ที่มีคุณภาพดีจะมีค่า อัตราส่วนของ A260/A280 อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 นำมาสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดน้ำยา RT-PCR master mix (with Oligo dT) (บริษัท GENEALL, Cat No.601-730) นำ mRNA มาเติม dH<sub>2</sub>O-DEPC จนมีปริมาตรรวม เป็น 10 μl ซึ่งสามารถคำนวณปริมาตร mRNA ที่ใช้ได้จากความเข้มข้น mRNA ที่วัดได้ นำไปป่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำยา Master mix 10 μl นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (บริษัท BioRad รุ่น T100) สังเคราะห์ cDNA ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และพักไว้ในเครื่องที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเก็บใน อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาทำ Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

โดยใช้ปริมาตรรวม 10  $\mu$ l ต่อ 1 Reaction ซึ่งประกอบด้วย 0.5  $\mu$ M Forward primer และ 0.5  $\mu$ M Reverse primer ปริมาตร 1  $\mu$ l ดังตารางที่ 3-2 นํ้ายา 2X iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix ปริมาตร 5  $\mu$ l และ cDNA ปริมาตร 4  $\mu$ lจากนั้นใส่ใน 96 well PCR plate (บริษัท Bio-Rad, Cat No.401001) หลุมละ 10  $\mu$ l จำนวน 4 ซ้ำ นำมาเข้าเครื่อง Real time-PCR system โดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำทั้งหมดจำนวน 40 รอบ

ตารางที่ 3-2 : ตารางแสดง Primer sequence ของ Osteogenic marker differentiation

Gene	Primer Sequence (forward/reversc)	Target template
GAPDH	5'- GTTCCAATATGATTCCACCC-3'	NM_001289746.1 Homo sapiens glyceraldehyde3phosphate dehydrogenase (GAPDH)
	5'- AGGGATGATGTTCTGGAGAG-3'	
OPN	5'-CATGAGAATTGCAGTGATTTGCT-3'	NM_000582.2 Homo sapiens secreted phosphoprotein 1 (SPP1), transcript variant 2, mRNA
	5'-CTTGGAAGGGTCTGTGGGG-3'	
OC	5'- GGCGCTACCTGTATCAATGG-3'	NM_199173.5 Homo sapiens bone gamma- carboxyglutamate protein (BGLAP), mRNA
	5'- TCAGCCAACCTCGTCACAGTC -3'	
RUNX2	5'-GTACAGCTTTAAGGATTCCCTCAATTC-3'	NM_001278478.1 Homo sapiens runt related transcription factor 2 (RUNX2), transcript variant 4, mRNA
	5'-TTGCTAATGCTTCGTGTTTCCA-3'	
	5'-GTGGAGTTCAGATGATCAGC-3'	

## บทที่ 4

### ผลและวิเคราะห์การศึกษา

#### 4.1 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมี

เมื่อนำส่วนสกัด hexane 24.1931 กรัม ที่ได้จากการสกัดลำดับส่วน มาแยกให้ละเอียดขึ้นด้วย flash column chromatography จะได้ fraction ย่อยทั้งหมด 87 fractions และจากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของแต่ละ fraction ด้วย TLC ทำให้สามารถรวม fraction ย่อยได้เป็นทั้งหมด 46 fractions ได้แก่ 1H ถึง 46H โดยมีลักษณะและปริมาณของสารที่ได้ดังแสดงใน ตารางที่ 4-1

**ตารางที่ 4-1:** แสดงลักษณะทางกายภาพและปริมาณของ fraction ที่แยกได้จากส่วนสกัด hexane ด้วยเทคนิค flash column chromatography

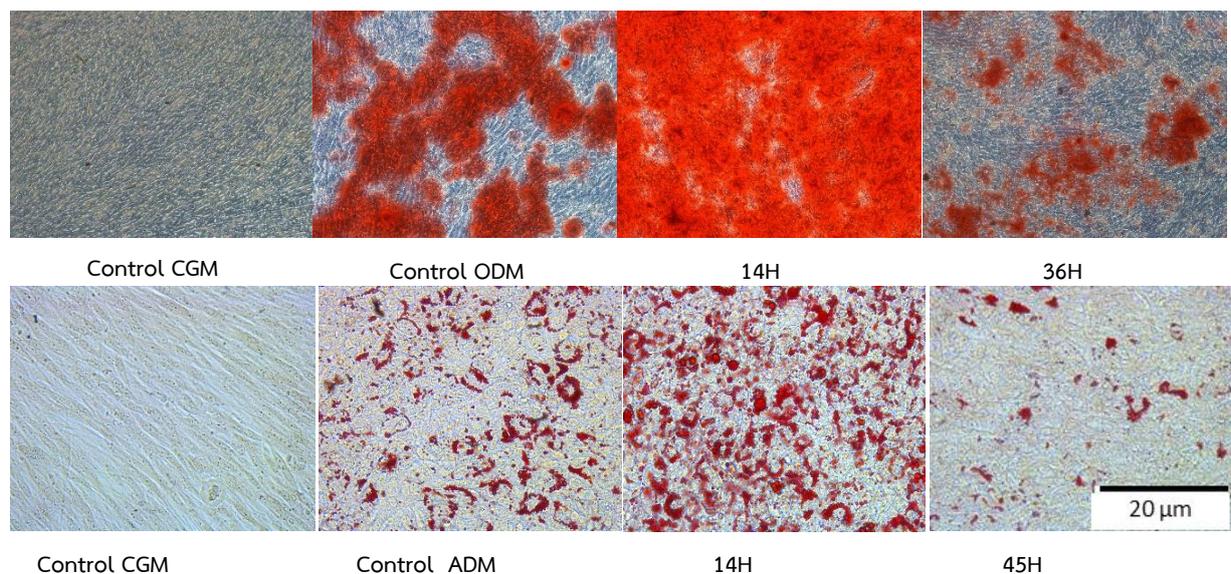
fraction	fraction ย่อย	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนัก (mg)	ร้อยละผลผลิต
1H	1	ของเหลวสีน้ำตาลเหลือง	trace	0.00
2H	2-4	ของเหลวสีเหลือง	trace	0.00
3H	5-8	ของเหลวสีเหลือง	6.1	0.03
4H	9	ของเหลวสีส้มแดง	143.0	0.59
5H	10-411	ของเหลวสีส้มแดง	1676.8	6.93
6H	12	ของเหลวสีเหลืองใส	141.3	0.58
7H	13	ของเหลวใสสีส้มมีผลึกปน	762.9	3.15
8H	14	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองส้ม	263.7	1.09
9H	15-16	ของเหลวสีส้ม	128.7	0.53
10H	17	ของเหลวสีเหลือง	83.0	0.34
11H	28-21	ของเหลวสีส้มแดง	754.5	3.12
12H	22	ของเหลวใสสีเหลืองส้ม	124.8	0.52
13H	23	ของเหลวใสสีส้ม	340.3	1.41
14H	24	ของเหลวใสสีส้ม	247.2	1.02
15H	25-28	ของแข็งสีส้ม	536.6	2.22
16H	29	ของเหลวสีเหลือง	84.0	0.35
17H	30-31	ของเหลวสีเหลือง	114.3	0.47
18H	32-33	ของเหลวสีเหลือง	86.4	0.36
19H	34-37	ผลึกสีเหลืองอมเขียว	238.0	0.98
20H	38-39	ของแข็งสีเหลืองขุ่น	276.2	1.14
21H	40-44	ผลึกใสไม่มีสี	893.6	3.69

22H	45-47	ผลึกสีเขียวอมดำ	251.0	1.04
23H	48-50	ของเหลวสีเขียวอมดำ	369.7	1.53
24H	51-56	ของแข็งสีดำ	1870.3	7.73
25H	57	ของเหลวสีดำ	487.2	2.01
26H	58-59	ของเหลวหนืดสีเขียวอมดำ	391.5	1.62
27H	60-61	ของเหลวกึ่งแข็งสีดำ	335.3	1.39
28H	62	ของเหลวกึ่งแข็งสีดำ	171.9	0.71
29H	63-64	ของเหลวกึ่งแข็งสีดำ	242.3	1.00
30H	65	น้ำมันสีดำ	79.9	0.33
31H	66-67	ของเหลวกึ่งแข็งสีดำอมน้ำตาล	293.3	1.21
32H	68	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	186.1	0.77
33H	69-70	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	249.6	1.03
34H	71	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	220.8	0.91
35H	72-73	ของเหลวสีดำอมเขียว	766.6	3.17
36H	74	ของแข็งสีดำอมเขียว	126.1	0.52
37H	75	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	88.8	0.37
38H	76	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	72.9	0.30
39H	77	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	50.3	0.21
40H	78	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	70.0	0.29
41H	79	ของเหลวสีน้ำตาลดำมีผลึกปน	184.6	0.76
42H	80-81	ของแข็งสีเหลือง	273.4	1.13
43H	82	ของแข็งสีเหลืองปนดำ	296.1	1.22
44H	83-84	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	1854.6	7.67
45H	85	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	619.7	2.56
46H	86-87	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	5011.8	20.72

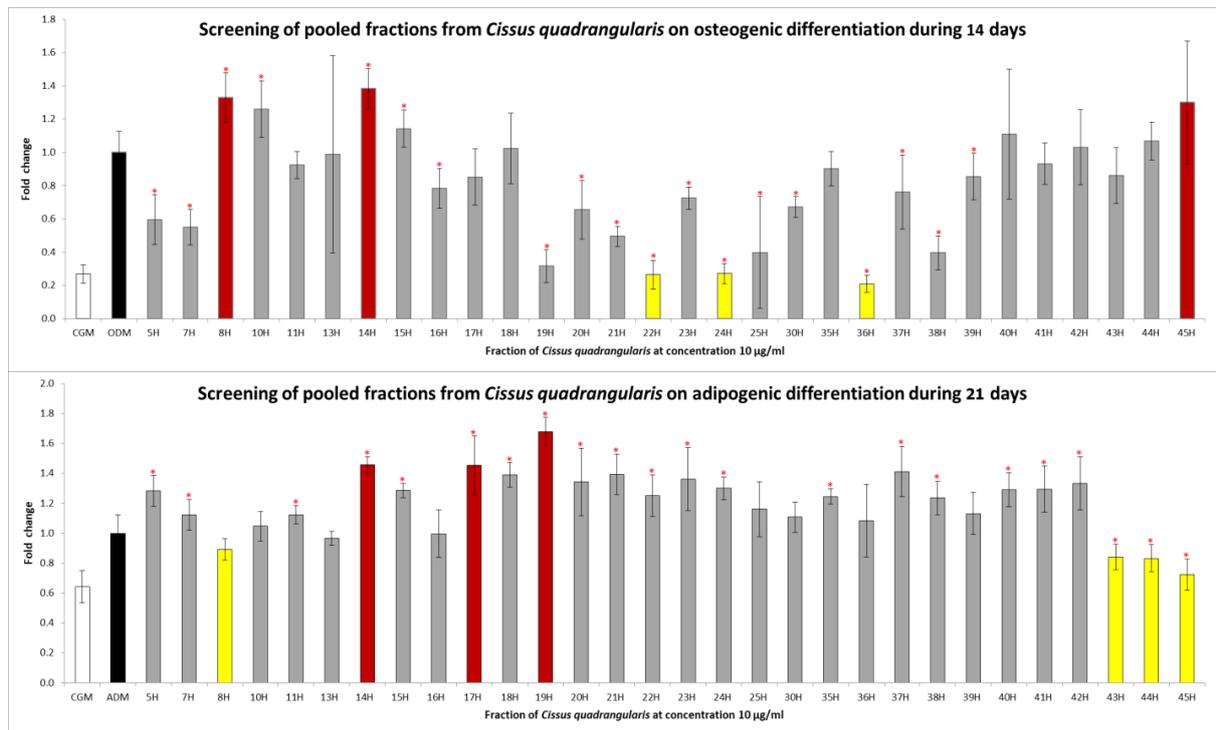
#### 4.2 ตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเพชรสังฆาต ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอล-สเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน

จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane 30 fractions ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกและเนื้อเยื่อไขมัน โดยตรวจวัดการสะสมแคลเซียมและการสะสมไขมันของเซลล์ตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane ที่แยกได้มีฤทธิ์ที่หลากหลายทั้งส่งเสริมและยับยั้ง การเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก และเนื้อเยื่อไขมัน (รูปที่ 4-2 และ 4-3)

จากผลการทดลองเบื้องต้น ได้คัดเลือก fraction ที่มีแนวโน้มจะส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกเพื่อศึกษาต่อ ทั้งที่มีฤทธิ์ส่งเสริมการสะสมไขมัน คือ 14H และออกฤทธิ์ยับยั้งการสะสมไขมัน คือ 8H และ 45 H โดยศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ การสะสมแคลเซียมของเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก การทำงานของเอนไซม์ Alkaline phosphatase (ALP) และศึกษาการแสดงออกของยีน



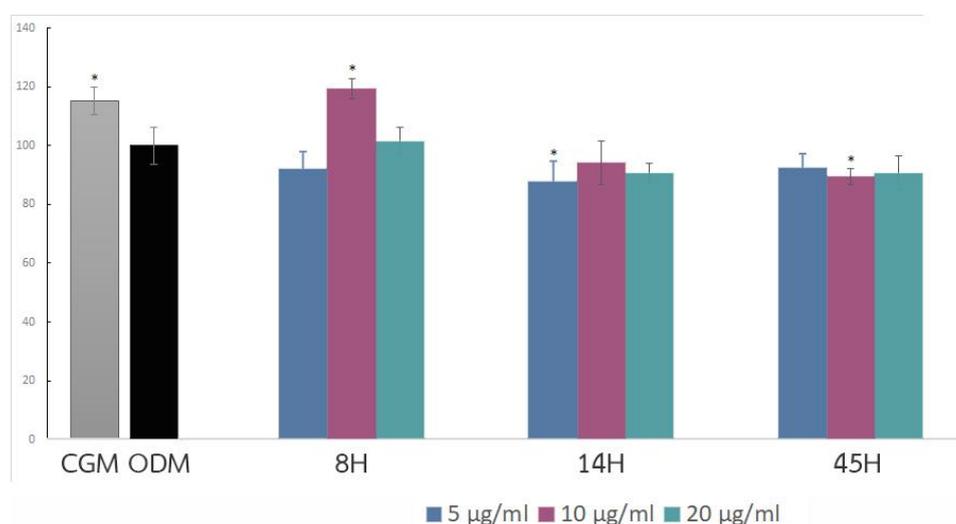
**รูปที่ 4-1:** แสดงผลของ fraction จากต้นเพชรสังฆาต ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก (บน) และเซลล์ในเนื้อเยื่อไขมัน (ล่าง) โดยศึกษาปริมาณการสะสมแคลเซียมจากการย้อมสี Alizarin red และการสะสมไขมันจากการย้อมสี Oil red O โดยเรียงเปรียบเทียบจาก กลุ่มควบคุมในอาหารที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ (Control CGM), กลุ่มควบคุมในอาหารที่ส่งเสริมเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก Control ODM, กลุ่มควบคุมในอาหารที่ส่งเสริมเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อไขมัน Control ADM, กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 14H และ 36H ในอาหาร ODM, กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 14H และ 45H ในอาหาร ADM



รูปที่ 4-2: กราฟแสดงสัดส่วนปริมาณการสะสมแคลเซียม (บน) และการสะสมไขมัน (ล่าง) ในมีเซนไคมอล-สเต็มเซลล์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane (H) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml จำนวน 30 fraction โดยสีขาวคือกลุ่มควบคุม control CGM สีดำคือกลุ่มควบคุม Control ODM หรือ Control ADM \*  $p$ -value < 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม ODM

#### 4.3 ตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่ออัตราการรอดชีวิตของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ ของส่วนสกัด 8H, 14H และ 45H ด้วยวิธี AlamarBlue cell viability assay

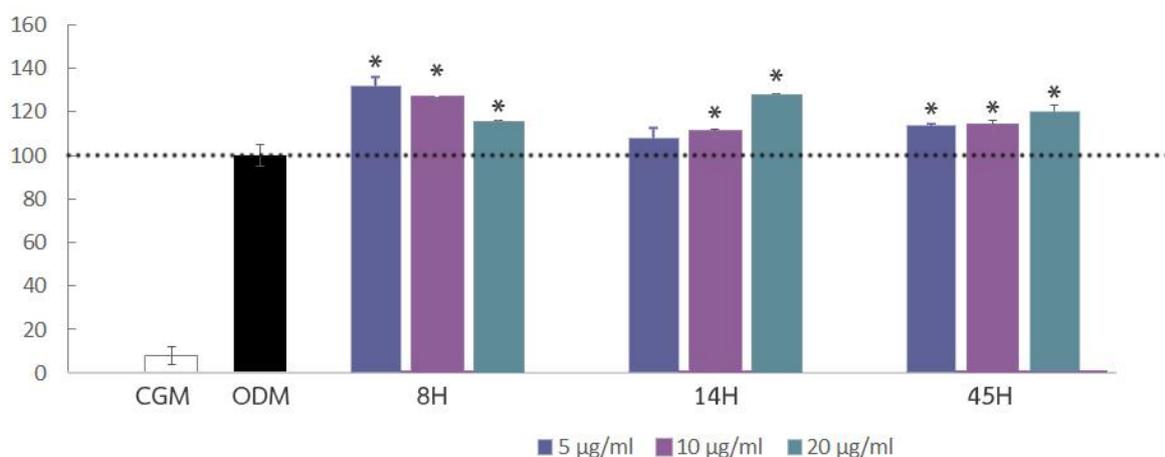
ศึกษาสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane ที่ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ 3 ลำดับส่วน คือ 8H และ 14H 45H ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  เป็นระยะเวลา 7 โดยแสดงผลออกมาในรูปของ % การรอดชีวิต โดยเมื่อ resazurin ใน alamar Blue ถูก Reduced จะทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีม่วงชมพูเพิ่มขึ้น แสดงถึงการมีชีวิตของเซลล์ พบว่าสารสกัด fraction 8H ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และ fraction 14H และ 8H มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ในความเข้มข้น โดยไม่มีลักษณะความเป็นพิษที่เพิ่มความรุนแรงตามความเข้มข้น ทั้งนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลง metabolic activity ของเซลล์ ซึ่งไม่ใช่การตายของเซลล์ ดังสังเกตได้จากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ส่งเสริมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูก (ODM) มีค่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ส่งเสริมการเจริญปกติ (CGM) รูปที่ 4-4



รูปที่ 4-3 : กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์มนุษย์ (UE7T-13) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัดเฮกเซน fraction ที่ 8H 14H และ 45H ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  ระยะเวลา 7 วัน ด้วยวิธี alamarBlue cell viability assay แสดงค่าเป็น Mean $\pm$ SD (n=6) \* p-value < 0.05

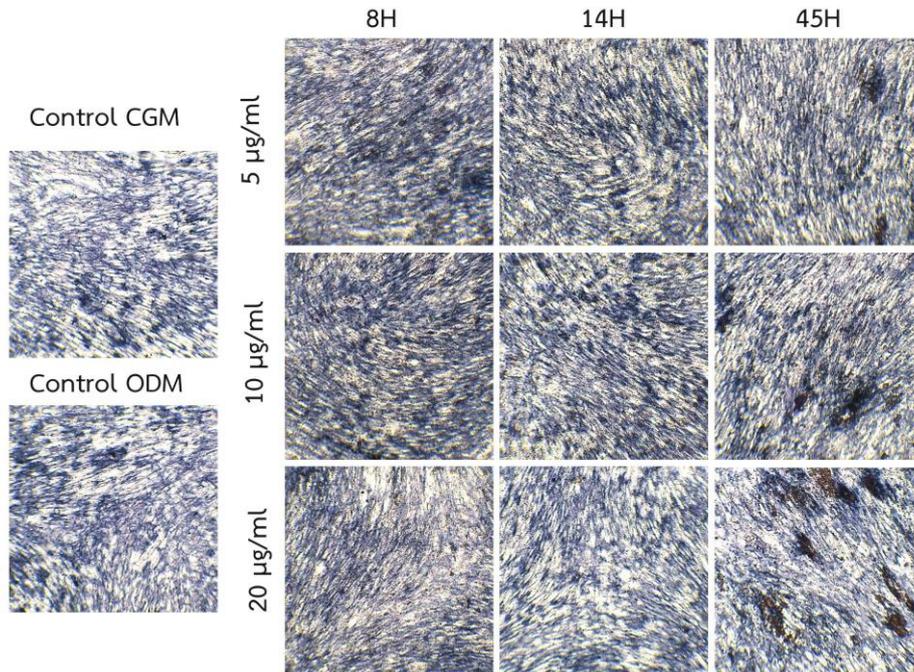
#### 4.4 ตรวจสอบการออกฤทธิ์ของส่วนสกัด 8H, 14H และ 45H ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก โดยศึกษาการสะสมแคลเซียม ด้วยวิธี Calcium liquid colorimetric assay และตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่าสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane ลำดับส่วน ที่ 14H 8H และ 45H ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  มีฤทธิ์ส่งเสริมการสะสมแคลเซียมของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบเป็นที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  ด้วยวิธี Calcium liquid colorimetric assay พบว่า ทุกลำดับส่วนของสารสกัดเพชรสังฆาตที่ผ่านการคัดเลือกมีฤทธิ์ส่งเสริมการสะสมแคลเซียมในเซลล์เพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน ยกเว้นลำดับส่วน 14H ที่ความเข้มข้น 5  $\mu\text{g/ml}$  (รูปที่ 4-5)

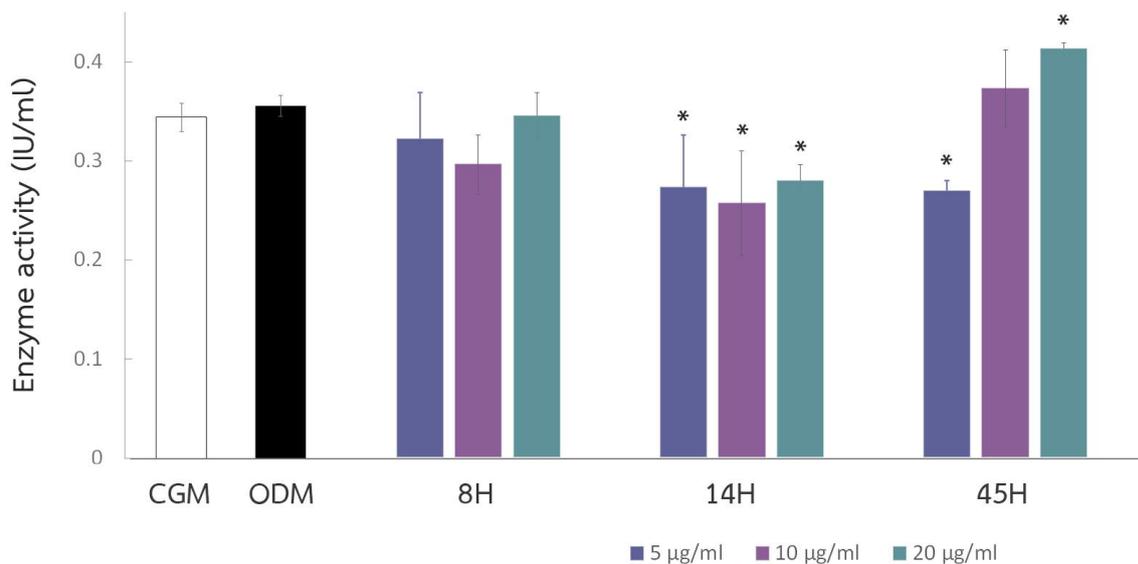


**รูปที่ 4-4 :** กราฟแสดงปริมาณแคลเซียมที่สะสมโดยเซลล์ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane (CQ-H) ลำดับส่วน 8H , 14H และ 45H ที่ความเข้มข้น 5 , 10 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  เป็นระยะเวลา 10 และ 14 วัน ด้วยวิธี Calcium liquid colorimetric assay , Mean  $\pm$  SD (n=4) \*  $p$ -value < 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม ODM

เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสะสมแร่ธาตุของเซลล์สร้างกระดูก โดยการย้อมสีและตรวจวัดจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ พบว่าที่ระยะเวลา 7 วัน ในทุกกลุ่มทดลอง รวมถึงกลุ่มควบคุมในอาหารที่ไม่มีสารส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก (CGM) มีการทำงานของเอนไซม์ ALP โดยจากภาพไม่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณ ALP ได้ เนื่องจากทุกกลุ่มทดลองมีการติดสีย้อมที่เข้มใกล้เคียงกัน(รูปที่ 4-6) โดยเมื่อตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ ALP พบว่าในกลุ่มควบคุม CGM และ ODM มีระดับการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่แตกต่างกัน fraction 14H ส่งผลให้เอนไซม์ ALP ทำงานลดลง และลำดับส่วนที่ 45H ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g/ml}$  มีการทำงานของเอนไซม์ ALP มากที่สุด (รูปที่ 4-7)



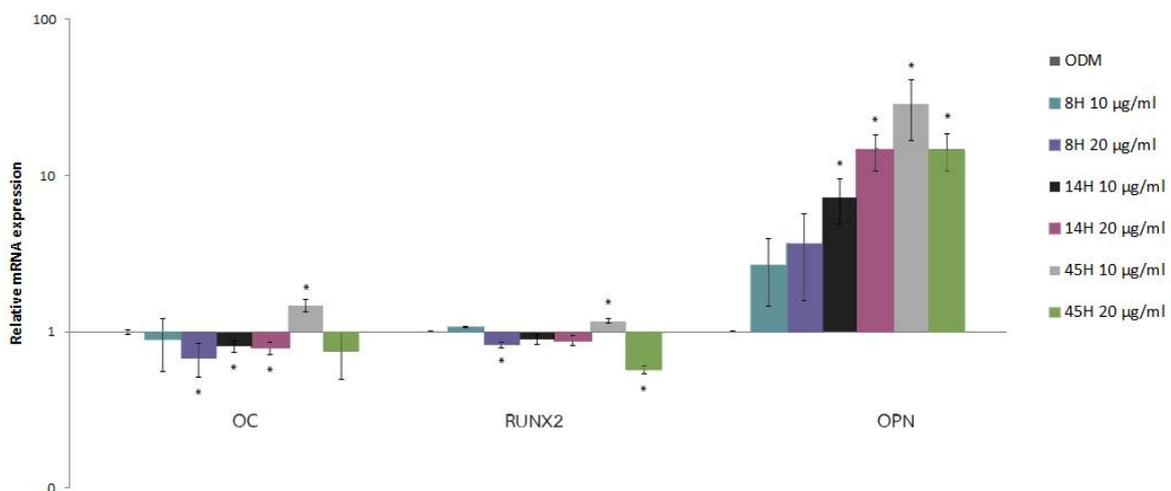
รูปที่ 4-5 : รูปแสดงการติดสีของเอนไซม์ ALP เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane (H) ที่ลำดับส่วน 8H 14H และ 45H และที่ความเข้มข้น 5 , 10 และ 20 µg/ml เป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยวิธี ALP staining ที่ถ่ายภายใต้กล้อง Inverted microscope ที่กำลังขยาย 4X



รูปที่ 4-6 : กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ ALP เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane (H) ที่ลำดับส่วน 8H, 14H, 45H เป็นระยะเวลา และ 7 วัน ด้วยวิธี Alkaline phosphatase activity, Mean  $\pm$  SD (n=4) \*  $p$ -value < 0.05

4.5 ตรวจสอบการออกฤทธิ์ของ fraction 8H, 14H และ 45H ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก โดยศึกษาการแสดงออกของ Osteogenic gene ด้วยวิธี Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

ศึกษาสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane ที่ส่งเสริมการสะสมแคลเซียมในเนื้อเยื่อกระดูกมากทั้ง 3 ลำดับส่วน คือ 14H 8H และ 45H ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 10 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 14 วัน โดยในการศึกษาครั้งนี้จะสนใจศึกษา Osteogenic marker gene ประกอบไปด้วย Osteocalcin (OC), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) และ Osteopontin (OPN) พบว่า fraction 45H ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  เพิ่มการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ตัว โดยส่งผลต่อการแสดงออกของ OPN มากที่สุดถึงโดยส่งผลให้เกิดการแสดงออกเพิ่มขึ้นถึง 28 เท่า fraction 14H ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  และ 20  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้การแสดงออกของยีน OC ลดลง เหลือ 0.8 เท่า และ fraction 8H ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g/ml}$  ส่งผลให้การแสดงออกของยีน OC และ Runx2 ลดลง (รูปที่ 4-8)



รูปที่ 4-8 : กราฟการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูก Osteocalcin (OC), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) และ Osteopontin (OPN) เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเพชรสังฆาตในส่วนสกัด Hexane (H) เป็นระยะเวลา 14 วัน ด้วยวิธี Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), Mean  $\pm$  SD (n=4)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์สกัดจากต้นเพชรสังฆาในตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยวิธีสกัดลำดับส่วนและคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยมีการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 30 fractions จากนั้นคัดเลือก fraction จากฤทธิ์ในการส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก ทั้งที่มีฤทธิ์ส่งเสริมและยับยั้งการสะสมไขมัน ได้ 3 fractions คือ 8H, 14H และ 45H ตรวจสอบฤทธิ์ในการส่งเสริมการสร้างกระดูกโดยตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงสภาพของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูก จากการสะสมแคลเซียม การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP) และการแสดงออกของยีน โดยพบว่าทั้ง 3 fractions ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในลักษณะที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น แต่อาจสารสกัดอาจส่งผลต่อกิจกรรมภายในเซลล์ ทำให้เมื่อวัด metabolic activity พบว่าได้ค่าที่ลดลงประมาณ 10% โดยสารสกัดทั้ง 3 fractions ส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นเซลล์ในเนื้อเยื่อกระดูกของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ โดยส่งเสริมการสะสมแคลเซียมของเซลล์ เมื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ALP fraction 14H ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง fraction 45H ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ALP ในขณะที่ fraction 8H ไม่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALP จึงตรวจสอบในระดับการแสดงออกของยีน โดย fraction 45 ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ส่งผลให้ยีนทั้ง 3 ชนิดที่ตรวจสอบ OC, RUNX2 และ OPN มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ fraction 8H ส่งผลให้การแสดงออกของยีน OC และ RUNX ลดลง และ fraction 14H ส่งผลให้ยีน OC มีการแสดงออกลดลงแต่ส่งผลให้การแสดงออกของ OPN เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกลไกในระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันของ fraction 8H 14H และ 45H ที่คัดเลือกมา

### แนวทางในการดำเนินงานวิจัยต่อยอด

งานวิจัยครั้งนี้ได้สกัดแยกสารจากต้นเพชรสังฆาออกเป็น 30 fractions และได้คัดเลือก 3 fractions ที่มีแนวโน้มในการส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก ทั้งนี้พบว่า fraction ทั้ง 3 มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการสร้างกระดูกในมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ แต่มีกลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์ไขมันที่แตกต่างกัน การศึกษาต่อยอดโดยแยกสารออกฤทธิ์จากทั้ง 3 fractions วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มเติม หรือพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อเพิ่มสัดส่วนสารออกฤทธิ์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร จะนำไปสู่การพัฒนาการใช้สารสกัดจากต้นเพชรสังฆาต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Mishra G, Srivastava S, Nagori B. Pharmacological and therapeutic activity of *cissus quadrangularis*: An overview. International Journal of Pharmtech Research 2010;2(2):1298-310.
2. Madan C, Nayar S. A pharmacognostical study of the stem of *cissus quadrangularis* linn. 1959.
3. Oben JE, Enyegue DM, Fomekong GI, Soukontoua YB, Agbor GA. The effect of *cissus quadrangularis* (CQR-300) and a *cissus* formulation (CORE) on obesity and obesity-induced oxidative stress. Lipids in Health and Disease 2007;6(1):1.
4. Oben J, Kuate D, Agbor G, Momo C, Talla X. The use of a *cissus quadrangularis* formulation in the management of weight loss and metabolic syndrome. Lipids in Health and Disease 2006;5(1):1.
5. Chidambaram J, Carani Venkatraman A. *Cissus quadrangularis* stem alleviates insulin resistance, oxidative injury and fatty liver disease in rats fed high fat plus fructose diet. Food and Chemical Toxicology 2010 0;48 (8-9):2021-9.
6. Lekshmi RK, Rajesh R, Mini S. Ethyl acetate fraction of *cissus quadrangularis* stem ameliorates hyperglycaemia-mediated oxidative stress and suppresses inflammatory response in nicotinamide/streptozotocin induced type 2 diabetic rats. Phytomedicine 2015 9/15;22(10):952-60.
7. Shiozawa Y, Havens A, Pienta K, Taichman R. The bone marrow niche: Habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. Leukemia 2008;22(5):941-50.
8. Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. Rheumatology 2008;47(2):126-31.
9. Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz Siegmund M, Bader A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin derived fibroblasts. Experimental Dermatology 2008;17(11):925-32.

10. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98(8):2396-402.
11. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulatory Research* 2007;100(9):1249-60.
12. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation* 2006;113(12):1605.
13. Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology* 2008;47(2):126-31.
14. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells and Development* 2008;17(4):761-74.
15. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development* 2008;129(3):163-73.
16. Wagner DR, Lindsey DP, Li KW, Tummala P, Chandran SE, Smith RL, Longaker MT, Carter DR, Beaupre GS. Hydrostatic pressure enhances chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in osteochondrogenic medium. *Annals of Biomedical Engineering* 2008;36(5):813-20.
17. David V, Martin A, Lafage-Proust MH, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, Vico L, Guignandon A. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology* 2007;148(5):2553.
18. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Po Hui JH, Lee EH, and Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-

- derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* [Internet]. [revised 2007;25(3):750. .
19. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cell Biochemistry* 1997;64(2):278-94.
  20. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, LeBoff MS, Glowacki J. Age-related intrinsic changes in human bone marrow derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 2008;7(3):335-43.
  21. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994 Jan;134(1):277-86.
  22. Shin H, Temenoff JS, Bowden GC, Zygorakis K, Farach-Carson MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured on Arg-Gly-Asp modified hydrogels without dexamethasone and  $\beta$ -glycerol phosphate. *Biomaterials* 2005;26(17):3645-54.
  23. Charoenpanich A, Wall ME, Tucker CJ, Andrews DM, Lalush DS, Dirschl DR, Lobo EG. Cyclic tensile strain enhances osteogenesis and angiogenesis in mesenchymal stem cells from osteoporotic donors. *Tissue Engineering Part A* 2013;20(1-2):67-78.
  24. Charoenpanich A, Wall ME, Tucker CJ, Andrews DMK, Lalush DS, Lobo EG. Microarray analysis of human adipose-derived stem cells in three-dimensional collagen culture: Osteogenesis inhibits bone morphogenetic protein and wnt signaling pathways, and cyclic tensile strain causes upregulation of proinflammatory cytokine regulators and angiogenic factors. *Tissue Engineering Part A* 2011;17(21-22):2615-27.
  25. Sumanasinghe RD, Bernacki SH, Lobo EG. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: Effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Engineering* 2006;12(12):3459-65.

26. Hanson AD, Marvel SW, Bernacki SH, Baner AJ, van Aalst J, Lobo EG. Osteogenic effects of rest inserted and continuous cyclic tensile strain on hASC lines with disparate osteodifferentiation capabilities. *Ann Biomed Eng* 2009;37(5):955-65.
27. Suzu I, Goto H, Hiwatashi N, Hattori S, Rotjanapan K, Leeanansaksiri W, Okada S. Antioxidant and antityrosinase activity of *cissus quadrangularis* extract. *Natural Product Communications* 2013;8(5):629-30.
28. Kothari SC. Synergistic Mixture of Plant Extract from *Cissus Quadrangularis* and Soy Albumin; may Include Chromium, Selenium, Green Tea Extract, Vitamin B6, Vitamin B12 and/or Folic Acid; Obesity, Insulin Resistance Or Diabetes; Eating Disorders; Anticholest(TRUNCATED) 2006.
29. Jainu M, Mohan KV, Devi CS. Gastroprotective effect of *cissus quadrangularis* extract in rats with experimentally induced ulcer. *Indian Journal of Medical Research* 2006;123(6):799.
30. Jainu M, Devi CSS. Gastroprotective action of *cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: Role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions* 2006;161(3):262-70.
31. Heuer M, Clement K, Chaudhuri S, Molino M, Apong P. Composition and Method for Increasing the Metabolism of Free Fatty Acids and Facilitating a Favorable Blood Lipid 2007. (Patent)
32. Zhong L. Compositions and Methods for Obesity, Diabetes and Metabolic Syndrome Control and Management 2008. (Patent)
33. Kothari SC, Shivarudraiah P, Venkataramaiah SB, Koppolu KP, Gavara S, Jairam R, Krishna S, Chandrappa RK, Soni MG. Safety assessment of *cissus quadrangularis* extract (CQR-300): Subchronic toxicity and mutagenicity studies. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49(12):3343-57.
34. Rao MS, Potu B, Swamy N, Kutty G. *Cissus quadrangularis* plant extract enhances the development of cortical bone and trabeculae in the fetal femur. *Pharmacologyonline* 2007;3:190-202.

35. Shirwaikar A, Khan S, Malini S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. *J Ethnopharmacol* 2003;89(2):245-50.
36. Muthusami S, Gopalakrishnan V, Stanley JA, Krishnamoorthy S, Ilangoan R, Gopalakrishnan VK, Srinivasan N. *Cissus quadrangularis* prevented the ovariectomy induced oxidative stress in the femur of adult albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016;81:416-23.
37. Chidambaram J, Carani Venkatraman A. *Cissus quadrangularis* stem alleviates insulin resistance, oxidative injury and fatty liver disease in rats fed high fat plus fructose diet. *Food and Chemical Toxicology* 2010;48(8):2021-9.
38. Viswanatha Swamy AH, Kulkarni RV, Thippeswamy AH, Koti BC, Gore A. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cissus quadrangularis* stem extract against isoniazid-induced liver damage in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 2010 Dec;42(6):397-400.
39. Lee HJ, Choi BK, Jin YY, Suh JW. Bioactive materials: *Cissus quadrangularis* extracts decreases body fat through regulation of fatty acid synthesis in high-fat diet-induced obese mice. *Journal of Applied Biological Chemistry* 2016;59(1):49-56.
40. Chidambaram Murthy K, Vanitha A, Mahadeva Swamy M, Ravishankar G. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L. *Journal of Medicinal Food* 2003;6(2):99-105.
41. Potu BK, Bhat KM, Rao MS, Nampurath GK, Chamallamudi MR, Nayak SR, Muttigi MS. Petroleum ether extract of *Cissus quadrangularis* (Linn.) enhances bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and facilitates osteoblastogenesis. *Clinics* 2009;64(10):993-8.
42. Tasadduq R, Gordon J, Al-Ghanim KA, Lian JB, Van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Shakoori AR. Ethanol extract of *Cissus quadrangularis* enhances osteoblast differentiation and mineralization of murine Pre-Osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of Cell Physiology* 2016.
43. Parisuthiman D, Singhatanadgit W, Dechatiwongse T, Koontongkaew S. *Cissus quadrangularis* extract enhances biomineralization through up-regulation of MAPK-

- dependent alkaline phosphatase activity in osteoblasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2009;45(3-4):194-200.
44. Pathomwichaiwat T, Ochareon P, Ali Z, Khan I, Prathanturarug S. Stimulatory effect on osteoblast differentiation of compounds from *cissus quadrangularis* L. *Planta Medica* 2013;79(05):P74.
45. Greogory, A.C., Gun, G. W., Peister, A., & Prockop, D. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* 329, 77–84.
46. Sun, H., Wu, C., Dai, K., Chang, J., & Tang, T. (2006). Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. *Biomaterials* 27, 5651–5657.
47. Brancroft, N. G., Sikavitsas, I. V., Van den Dolder, J., Sheffield, L. T., Ambrose, G. C., Jansen, A. J., & Mikos G. A. (2002). Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *PNAS* 99, 12600-12605.
48. Montazerolghaem, M., Ning, Y., Engqvist, H., Ott, M. K., Tenje, M., & Mestres, G. (2016). Simvastatin and zinc synergistically enhance osteoblasts activity and decrease the acute response of inflammatory cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(2), 23.

## ภาคผนวก

### 1. ลักษณะของส่วนสกัดจากต้นเพชรสังฆาต

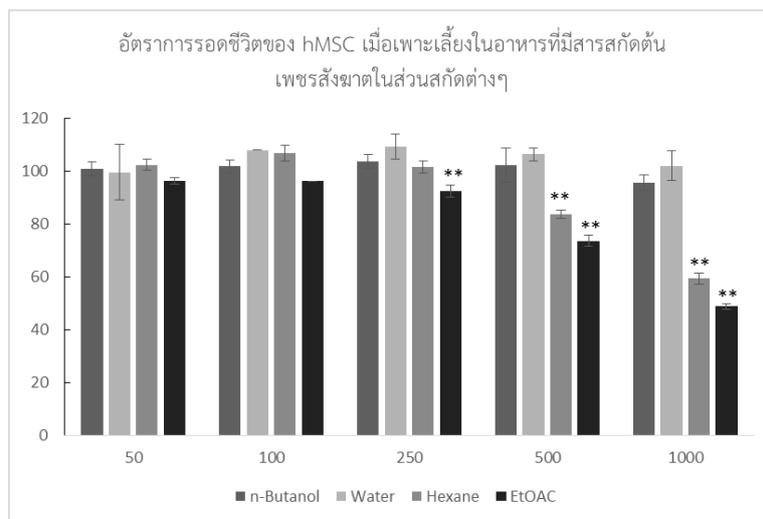
ลักษณะของส่วนสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในตัวทำละลาย Ethanol, Hexane, Ethyl acetate, n-Butanol และน้ำ



รูปที่ 1 ลักษณะและปริมาณสารสกัดในตัวทำละลายชั้นต่างๆ ก.) สารสกัดชั้น Ethanol ข.) สารสกัดชั้น Hexane ค.) สารสกัดชั้น Ethyl acetate ง.) สารสกัดชั้น n-Butanol จ.) สารสกัดชั้นน้ำ

## 2. ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในแง่ความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในส่วนสกัดจากการสกัดลำดับส่วน

ผลการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดเพชรสังฆาตในชั้นตัวทำละลาย โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีสารสกัดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดในชั้นน้ำและบิวทานอลมีความเป็นพิษต่ำ โดยที่ความเข้มข้นสูงถึง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และสารสกัดชั้นเฮกเซนที่ความเข้มข้นสูงถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของมีเซนไคมอลสเต็มเซลล์ เมื่อได้รับสารสกัดจากต้นเพชรสังฆาตในชั้นบิวทานอล น้ำ เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 50, 100, 250, 500, และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจวัดด้วย alamarBlue assay, n= 5, T-test (\*\*p<0.01)

## ภาคผนวก ข

### ประวัติผู้วิจัย

#### หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อติศรี เจริญพานิช  
Assistant Professor Dr. Adisri Charoenpanich
2. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์  
เลขที่ 6 ถนนราชมรรคาใน ต.สนามจันทร์ อ.เมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม 73000  
e-mail address: charoenpanich\_a@silpakorn.edu  
โทรศัพท์มือถือ: 092-327-9607  
โทรศัพท์ 034-273-045-6  
โทรสาร 034-255-820
3. ประวัติการศึกษา : ระดับการศึกษา สถาบัน และปีที่จบ  
- Ph.D. in Biomedical Engineering (2010-2013)  
University of North Carolina, Chapel hill and North Carolina State University, USA  
- M.Sc. in Biomedical engineering (2007-2010)  
University of North Carolina, Chapel hill and North Carolina State University, USA  
- วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2548
- 4 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ระบุสาขาวิชาการ  
สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา  
แขนงวิชา 1. Stem cells and tissue engineering
5. ผลงานวิจัย  
- **Charoenpanich, A.** (2016) Induced cell death in mesenchymal stem cells and cancer cell lines by Thai herbal extracts. Cell death 2016: New Concepts in Cell Death Research: From Basic Mechanisms to Clinical Opportunities, Girona, Spain, July 3-8, 2016  
- Tachapermpon, Y., Chaneam, S., **Charoenpanich, A.**, Wanichacheva, N., (2016) Highly Cu<sup>2+</sup>-sensitive and selective colorimetric and fluorescent probes: Utilizations in batch, flow

analysis and living cell imaging. Manuscript submitted to Sensors and Actuators B: Chemical on May 25, 2016

- **Charoenpanich, A.**, Gumlungpat, N., and Sinlapavilawan, P. (2016) Human mesenchymal stem cells recognize extracellular collagen as a sequence specific peptide or as amino acid substrates?. 10th World Biomaterials Congress (WBC), Montreal, Canada May 17-22, 2016.
- **Charoenpanich, A.**, Wall, M. E., Tucker, C. J., Andrews, D. M., Lalush, D. S., Dirschl, D. R., & Lobo, E. G. (2013). Cyclic Tensile Strain Enhances Osteogenesis and Angiogenesis in Mesenchymal Stem Cells from Osteoporotic Donors. *Tissue Eng Part A*. 2014 Jan;20 (1-2):67-78..
- **Charoenpanich, A.**, Wall, M. E., Tucker, C. J., Andrews, D. M. K., Lalush, D. S., & Lobo, E. G. (2011). Microarray analysis of human adipose-derived stem cells in three-dimensional collagen culture: Osteogenesis inhibits bone morphogenic protein and wnt signaling pathways, and cyclic tensile strain causes upregulation of proinflammatory cytokine regulators and angiogenic factors. *Tissue Engineering Part A*, Nov;17(21-22):2615-27
- Cha-um, S., **Charoenpanich, A.**, Roytrakul, S., & Kirdmanee, C. (2009). Sugar accumulation, photosynthesis and growth of two indica rice varieties in response to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), 477-486

## ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร.ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร

Dr. Panupun Limpachayaporn

2. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

เลขที่ 6 ถนนราชมรรคาใน ต.สนามจันทร์ อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม 73000

โทรศัพท์มือถือ: 082-8948764 โทรศัพท์: 034-255797 โทรสาร: 034-271356

E-mail address: panupun.lim@gmail.com

3. ประวัติการศึกษา : ระดับการศึกษา สถาบัน และปีที่จบ

ปีการศึกษา 2546 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2551 Diplom (Chemie) Georg-August-Universität Göttingen

ปีการศึกษา 2555 Dr. rer. nat. (Chemistry) Westfälische Wilhelms-Universität Münster

4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช แขนงวิชา

- การแยกและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืช

- ออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

- พัฒนาโมเลกุลออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และต้านกระบวนการเมตาบอลิซึมของ

ร่างกาย

5. ผลงานทางวิชาการ

1) Tuntiwachwuttikul, P.; Pootaeng-on, Y.; Phansa, P.; **Limpachayaporn, P.**; Charoenchai, P.; Taylor, W. C. Constituents of the leaves of *Holarrhena pubescens*. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 271-273.

2) **Limpachayaporn, P.**; Schäfers, M.; Schober, O.; Kopka, K.; Haufe, G. Synthesis of new fluorinated, 2-substituted 5-pyrrolidinylsulfonyl isatin derivatives as caspase-3 and caspase-7 inhibitors: Nonradioactive counterparts of putative PET-compatible apoptosis imaging agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2025-2036.

3) **Limpachayaporn, P.**; Riemann, B.; Kopka, K.; Schober, O.; Schäfers, M.; Haufe, G. Influence of 4- or 5-substituents on the pyrrolidine ring of 5-[1-(2-

methoxymethyl(pyrrolidiny) sulfonyl] isatin derivatives on their inhibitory activities towards caspases-3 and -7. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 562-578.

4) **Limpachayaporn, P.**; Wagner, S.; Kopka, K.; Hermann, S.; Schäfers, M.; Haufe, G. Synthesis, <sup>18</sup>F-Radiolabeling, and in Vivo Biodistribution Studies of *N*-Fluorohydroxybutyl Isatin Sulfonamides using Positron Emission Tomography. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4509-4520.

5) **Limpachayaporn, P.**; Kumbhar, S.; Waller, M. P.; Wagner, S.; Kopka, K.; Schober, O.; Schäfers, M.; Haufe, G. Synthesis and Docking Studies of 7-Halogenated Isatin Sulfonamides: Nonradioactive Counterparts of Future Caspase-3/ -7 Inhibitor-based Radiopharmaceuticals for Molecular Imaging of Apoptosis *J. Med. Chem.* manuscript in preparation.